DIE HEMMUNG DES EINBAUS RADIOAKTIV-MARKIERTER STOFFWECHSEL-PRÄKURSOREN IN PHYTHÄMAGGLUTININ-STIMULIERTE NORMALE LYMPHOZYTEN DURCH DAS ENZYM L-ASPARAGINASE

Klaus Hanke

1971

Aus der I. Med. Abteilung des Städtischen Krankenhauses
München-Schwabing

Direktor: Professor Dr. H. Begemann

DIE HEMMUNG DES EINBAUS RADIOAKTIV-MARKIERTER STOFFWECHSEL-PRÄKURSOREN IN PHYTHÄMAGGLUTININ-STIMULIERTE NORMALE LYMPHOZYTEN DURCH DAS ENZYM L-ASPARAGINASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Hanke

aus

Bremen

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Begemann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Seitz
	Prof. Dr. W. Stich
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1971

Im Jahre 1953 entdeckte Kidd (33), daß Meerschweinchen-Serum intraperitoneal injiziert eine deutliche Wachstumshemmung und Rückbildung bei Gardner-Lymphosarkomen der Maus, des Lorenz-Lymphomas II der Maus und des Murphy-Sturm-Lymphosarkoms der Ratte bewirkte. Dabei schien eine wirksame Komponente, die im Meerschweinchen-Serum mit der Globulin-Fraktion wanderte und relativ hitzebeständig war, für die Antitumorwirkung verantwortlich zu sein. Schon Clementi (15) fand 1922, daß auffallenderweise Meerschweinchen-Serum das Enzym L-Asparaginase in großen Mengen enthält. Broome (11) konnte 1961 zeigen, daß es sich bei der antiproliferativ wirkenden Substanz um das Enzym L-Asparaginase handelte. Ausgehend von diesen tierexperimentellen Untersuchungen führte Dolowy et al. (21) 1966 erstmals eine Behandlung eines 8jährigen Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie mit partiell gereinigtem Meerschweinchen-Serum durch. Eine Anwendung in größerem Umfang wurde durch die Beobachtung von Mashburn und Wriston (40) 1964 möglich, daß E.coli ebenfalls eine wirksame L-Asparaginase enthält. 1967 wurde von Hill (25) und Oettgen (43) erstmals über die Anwendung von E.coli L-Asparaginase bei akuten lymphatischen Leukämien und Lymphosarkomen berichtet. Seither liegen zahlreiche Mitteilungen über die Anwendung von L-Asparaginase zur Behandlung akuter Leukämien vor (Burchenal; 12, 13; Begemann; 9; Oettgen; 43).
1963 konnte Broome (11) zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen der Senkung des Asparaginspiegels im Serum und der Rückbildung von bestimmten Tumoren besteht. Er beobachtete, daß es offensichtlich Tumorzellen gibt, die auf die Zufuhr von Asparagin aus der Umgebung angewiesen sind, da sie aufgrund eines Stoffwechseldefektes selbst nicht in der Lage sind, die nicht essentielle Aminosäure L-Asparagin zu synthetisieren. Bei diesen Tumoren führt eine Zerstörung des exogenen Asparagins zu einer Mangelsituation, an der die sensiblen Zellen zugrunde gehen. Die Zellen,

die über eine ausreichende Asparagin-Synthetase verfügen, sollten durch L-Asparaginase in ihrer Vitalität nicht beeinflußt werden. Damit wären die Voraussetzungen für ein spezifisch wirkendes Zytostatikum gegeben, durch das nur Tumorzellen geschädigt würden, während die normalen Zellen unbeeinflußt bleiben würden.
Leider haben sich diese Hoffnungen nicht erfüllt. Denn Becker et al. (8) hatten eine Verzögerung der primären Mitosewelle der Rattenleber nach Teilhepatektomie durch L-Asparaginase nachgewiesen. Adamson et al. (6) berichteten über eine erhöhte Mißbildungsrate bei Kaninchenembryonen nach Behandlung der Muttertiere mit L-Asparaginase. Auch die zahlreichen Nebenwirkungen bei Patienten mit akuter Leukämie, die mit L-Asparaginase behandelt wurden, waren auf eine unspezifische Hemmung der Proteinsynthese zurückzuführen.
In letzter Zeit wurde verschiedentlich über eine immunosuppresive Wirkung von E.coli Asparaginase berichtet. So beschrieb Hobik (27) die Unterdrückung der graft-versus-host Reaktion in Ratten und Mäusen. Bertelli et al. (10) fanden eine verzögerte Abstoßung von allogenen und xenogenen Hauttransplantaten bei Mäusen. Schulten et al. (53) wiesen ebenfalls eine Wirkung von L-Asparaginase auf die Transplantatabstoßung nach.
Nicht nur zelluläre Immunreaktionen, sondern auch die humorale Antikörperbildung wird durch L-Asparaginase beeinflußt (Schwartz; 52; Muller-Bérat; 42; Lauenstein; 38; Prager et al.; 47; Khan; 32). Khan et al. (31) berichteten über eine Unterdrückung der allergischen Enzephalomyelitis bei Ratten durch L-Asparaginase. Inzwischen liegen Mitteilungen über die Anwendung von L-Asparaginase bei menschlichen Autoimmunerkrankungen vor (Fink et al.; 24), so daß sich für dieses Enzym außer bei akuten Leukämien auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen ein neues Indikationsgebiet ergeben könnte.
Die Wirkungsweise der L-Asparaginase bei Immunreaktionen ist noch weitgehend unbekannt. Mit PHA oder

spezifischen Antigenen stimulierte Lymphozytenkulturen stellen ein geeignetes Versuchsmodell dar, die Proliferationsvorgänge einer Immunreaktion in vitro genauer zu beobachten. Anhand dieser Kulturen ist es möglich, der mitotischen Teilung vorausgehende Steigerungen der Protein- und RNA-Synthese, die Umwandlung der Lymphozyten in große basophile Blasten und die sich anschließende DNA-Synthese genau zu beobachten. Das in - vitro - System ist geeignet, antimitotische oder proliferativ hemmende Substanzen exakt zu untersuchen.

Astaldi und Mitarbeiter (2) berichteten 1969 erstmals über die Wirkung von L-Asparaginase auf Lymphozytenkulturen. Sie fanden dabei, daß das Enzym nicht nur auf sensible Leukämie- und Tumorzellen wachstumshemmend wirkte, sondern auch die Blastentransformation normaler, menschlicher Lymphozyten unterdrückte, die unspezifisch (z.B. mit PHA) oder mit spezifischen Antigenen stimuliert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die L-Asparaginase die Blastentransformation nahezu vollständig unterdrückt, ohne die Vitalität der Lymphozyten zu beeinträchtigen. Die Beurteilung von L-Asparaginase auf die Blastentransformation erfolgte in diesen Untersuchungen anhand morphologischer Kriterien. Genauere Aufschlüsse über die Wirkung von L-Asparaginase auf PHA stimulierte Lymphozyten können jedoch erst erwartet werden, wenn genauere Stoffwechseluntersuchungen durchgeführt werden. Eine Möglichkeit dazu bietet die Untersuchung der Beeinflussung des Einbaus radioaktivmarkierter Stoffwechselpräkursoren im Ablauf des Transformationsprozesses durch L-Asparaginase. Bis zu unserem Versuchsbeginn lagen derartige Analysen nicht vor. Wir haben daher den Einbau von ^{3}H-Leucin, ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Thymidin in PHA-stimulierte Lymphozytenkulturen untersucht, denen das Enzym entweder zeitgleich oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation zugesetzt wurde.

Wir legten uns dabei folgende Fragen vor:

1) Ab wann wirkt L-Asparaginase auf PHA-inkubierte Lymphozyten?

2) Wie wirkt ein verzögerter Zusatz von L-Asparaginase auf bereits stimulierte Lymphozyten?

Da nicht nur die PHA-induzierte Proliferation der Lymphozyten durch L-Asparaginase unterdrückt wird, sondern auch die Blastogenese nach spezifischer Antigenstimulation, scheint uns die Beantwortung der Fragen nicht nur von theoretischem Interesse, sondern auch von Bedeutung für die Anwendung der L-Asparaginase in der klinischen Medizin.

METHODEN

Gesunden Blutspendern wurden 500 ml heparinisiertes Venenblut entnommen. Zur Trennung der Erythrozyten wurde Plasmagel im Verhältnis 3:1 zugesetzt und das Blut 20 Minuten bei 37° inkubiert. Der leukozytenreiche Überstand wurde abpipettiert und bei 1000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Plasmaüberstand verworfen und die Zellen in Eagle's Minimum Essential Medium (MEM-S), dem Penicillin-Streptomycin zugesetzt worden war, resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen (bei 1000 rpm, 10 Minuten) wurde die Leukozytensuspension in komplettem Medium

(= MEM + 1 % Pen-Strepto 4 Teile
Fetal-Calf-Serum 1 Teil
200 mM L-Glutamin = 1 %)

aufgefangen und in eine speziell angefertigte Trennsäule gegeben, die mit Nylon-Watte gestopft worden war. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die Lymphozyten mit komplettem Medium aus der Säule eluiert. Auf diese Weise wurden durchschnittlich 95 % - 100% reine Lymphozytensuspensionen gewonnen. Nach Zellzählung und Differenzierung wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 10^6 Lymphozyten/ml komplettes Medium eingestellt und in Bijoux-Fläschchen abgefüllt. PHA (B.Wellcome) wurde in einer Konzentration von 0,025 ml (Inhalt einer Originalflasche mit 5 ml Aqua dest. gelöst) und L-Asparaginase

(Crasnitin^{R} der Firma Bayer) verwendet. Anschließend wurden die Lymphozytenkulturen bei 37° die erforderliche Zeit kultiviert. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde unter streng sterilen Kautelen gearbeitet.

Folgende Versuchsanordnung wurde getroffen:

1) Kontrollkulturen
2) PHA-Kulturen
3) PHA + L-Asparaginase - Kulturen
4) L-Asparaginase-Kulturen

Jeweils 1 Stunde vor der Ernte wurden den Kulturen 1 µC ^{3}H-Thymidin (spez. Aktivität 5 C/mM) bzw. 2 µC ^{3}H-Uridin (spez. Aktivität 5 C/mM) oder 2 µC ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 1 C/mM) zugesetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eisgekühlte Zentrifugengläser überführt und die Kulturgefäße mit kalter physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Es schloß sich die Zentrifugation der Zellen bei 2000 rpm für 10 Minuten an. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen aufgeschüttelt und mit 5 % Trichloressigsäure gefällt. Nach 15 Minuten wurden die denaturierten Zellen bei 2000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, und die zentrifugierten Zellen anschließend in Hyamin 10-X resuspendiert (Dauer: 24 Stunden). Der gesamte Kulturröhrcheninhalt wurde dann in ein Szinitillationsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 70-75° inkubiert. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden 15 ml der Szintillationsflüssigkeit (400 g Naphthalein; 28 g PPO; 1,2 g POPOP ad 3,8 l Dioxan) zugegeben. Die Impulsraten wurden in einem Tricarb-Liquid-Szintillation-Spektrometer (Packard Instruments Model 3003) gemessen. Alle Kulturen wurden jeweils als Dreifachbestimmungen angefertigt und zweimal im Szintillationszähler je 10 Minuten gemessen. Die Impulsraten wurden auf 10^{6} Zellen/Minute angegeben.

ERGEBNISSE

In einer ersten Versuchsreihe wurde den Lymphozyten L-Asparaginase zeitgleich mit PHA zugesetzt und anschließend der Einbau von ^{3}H-Thymidin in die säureunlösliche Fraktion 24, 36, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn bestimmt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die keinen Zusatz oder lediglich L-Asparaginase enthielten. Abb. 1 und Tabelle 1 geben die Mittelwerte der Einbauraten von ^{3}H-Thymidin bei 8 Spendern wieder.
In unstimulierten Kulturen, d.h. PHA-freien Kontrollkulturen, wurde während der gesamten Beobachtungszeit kein Anstieg des ^{3}H-Thymidineinbaus gemessen. Dagegen trat in PHA behandelten Kulturen 24 bis 36 Stunden nach Versuchsbeginn eine deutliche Steigerung der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation auf. Sie erreichte nach 72 Stunden ihr Maximum mit einem 22fach höheren Wert, als er in Leerkulturen gemessen wurde. Bereits nach 36stündiger PHA-Inkubation konnte ein deutlicher Unterschied gegenüber PHA-freien Kulturen festgestellt werden. In Kulturen, die PHA und zusätzlich L-Asparaginase seit Kulturbeginn enthielten, war nach 24 bis 36 Stunden und während der weiteren Kulturperiode keine Steigerung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus nachzuweisen. Die dabei gemessenen Radioaktivitäten unterschieden sich während der ganzen Beobachtungszeit nicht wesentlich von den Werten, die in PHA-freien Kontrollkulturen gefunden wurden. Auch in Kulturen, die lediglich L-Asparaginase enthielten, wurde während der Kulturdauer kein deutlicher Unterschied zu Kontrollen gemessen.

In einer Reihe von fünf Versuchen wurde L-Asparaginase den Lymphozytenkulturen zeitgleich mit PHA zugesetzt und anschließend der Einbau von ^{3}H-Uridin nach 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn bestimmt. Abb. 2 und Tabelle 2 geben die Mittelwerte aus diesem Versuchsansatz wieder.

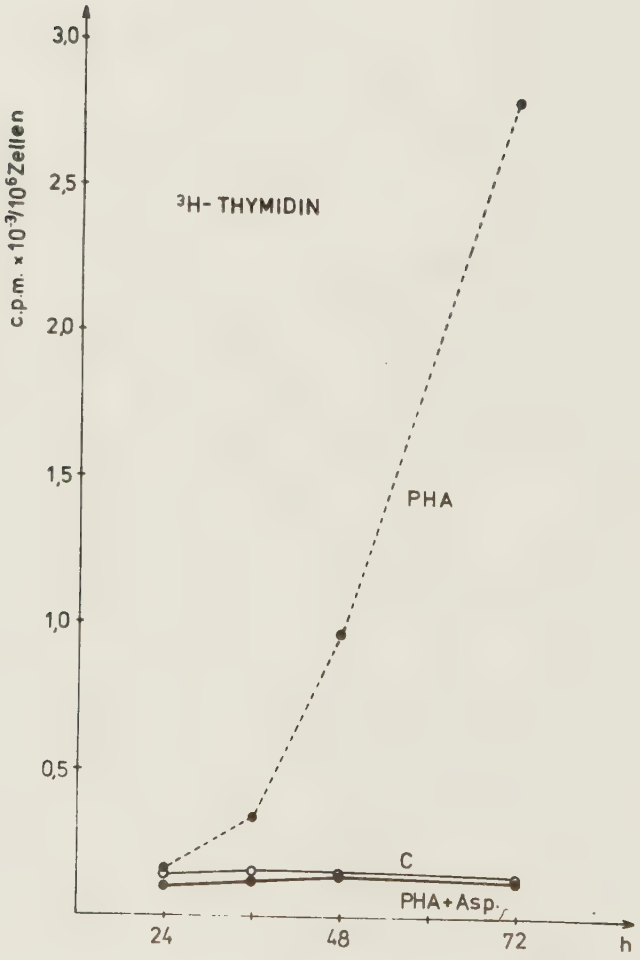
TABELLE 1

^{3}H - Thymidin

Ernte nach	24 Std.	36 Std.	48 Std.	72 Std.
PHA	157	328	962	2788
PHA + L-Asparaginase	89	115	126	125
Kontrollen	139	147	143	124
L-Asparaginase	100	124	119	160

Mittelwerte der Inkorporationsraten (c.p.m. x $10^{-3}/10^{6}$ Zellen) von ^{3}H-Thymidin aus 8 Versuchen; die Ernte erfolgte nach 24, 36, 48 und 72 Stunden Kulturdauer.

A B B. 1



Gleichzeitige Zugabe von L-Asparaginase und PHA;die Messungen der ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsraten erfolgten nach 24,36,48 und 72 Stunden.

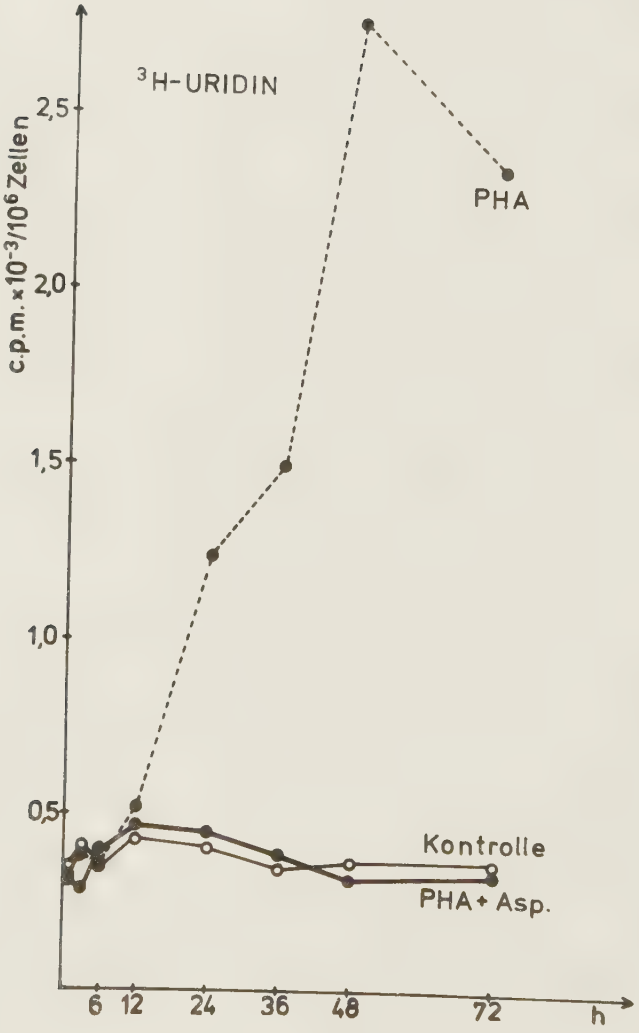
TABELLE 2

^{3}H - Uridin

Ernte nach	1 Std.	3 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.	36 Std.	48 Std.	72 Std.
PHA	32	38	36	52	124	150	277	235
PHA + L-Asparaginase	31	29	40	47	45	39	32	44
Kontrollen	35	41	35	43	41	35	37	37
L-Asparaginase	39	40	36	40	36	33	26	31

Mittelwerte der Inkorporationsraten (c.p.m x $10^{-3}/10^{6}$ Zellen) von ^{3}H-Uridin aus 5 Versuchen;
die Ernte erfolgte nach 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden Kulturdauer.

A B B. 2



Gleichzeitige Zugabe von L-Asparaginase und PHA; die Messungen der ^{3}H-Uridin-Inkorporationsraten erfolgten nach 1,3,6,12,24,36,48 und 72 Stunden.

Während der gesamten Versuchsperiode wurden in PHA - freien Kontrollkulturen nahezu konstante ^{3}H-Uridin-Inkorporationsraten gemessen. In den mit PHA behandelten Kulturen trat 12 bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn eine deutliche Steigerung des ^{3}H-Uridin-Einbaus auf, die nach 48 Stunden ihr Maximum erreichte. Zu diesem Zeitpunkt lag der Mittelwert 7fach höher als der in unstimulierten Kontrollkulturen. Nach 72 Stunden fiel die Einbaurate von ^{3}H-Uridin wieder ab. 24 Stunden nach PHA-Zusatz und während der weiteren Kulturdauer konnte ein deutlicher Unterschied gegenüber PHA-freien Kontrollkulturen festgestellt werden. In Lymphozytenkulturen, die außer PHA seit Kulturbeginn L-Asparaginase enthielten, wurden während der gesamten Beobachtungszeit Inkorporationsraten von ^{3}H-Uridin gemessen, die sich nicht wesentlich von den unstimulierten Leerkulturen unterschieden. 12 Stunden nach Versuchsbeginn lagen die Radioaktivitäten von Kulturen, die PHA und L-Asparaginase enthielten, in allen Ansätzen etwas über denen von PHA-freien Kontrollkulturen. Doch war der Unterschied nur sehr gering. In Kulturen, die lediglich L-Asparaginase enthielten, differierten die Einbauraten nicht wesentlich von denen der Kontrollen.

In fünf Versuchsansätzen wurde L-Asparaginase in Lymphozytenkulturen zeitgleich mit PHA gegeben und anschließend der Einbau von 2 µC ^{3}H-Leucin in die säureunlösliche Fraktion 1, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Kulturbeginn bestimmt. Die Tabelle 3 und die Abb. 3 und 4 geben die Mittelwerte während der gesamten Versuchsdauer bzw. während der ersten 24 Stunden wieder.
In den PHA-freien Kontrollkulturen wurde während der gesamten Beobachtungszeit nach einstündiger Inkorporation von ^{3}H-Leucin Einbauraten gemessen, die nahezu konstant waren. In den mit PHA behandelten Kulturen trat bereits 6 Stunden nach Beginn der Kultur eine gesteigerte Inkorporation von ^{3}H-Leucin auf.

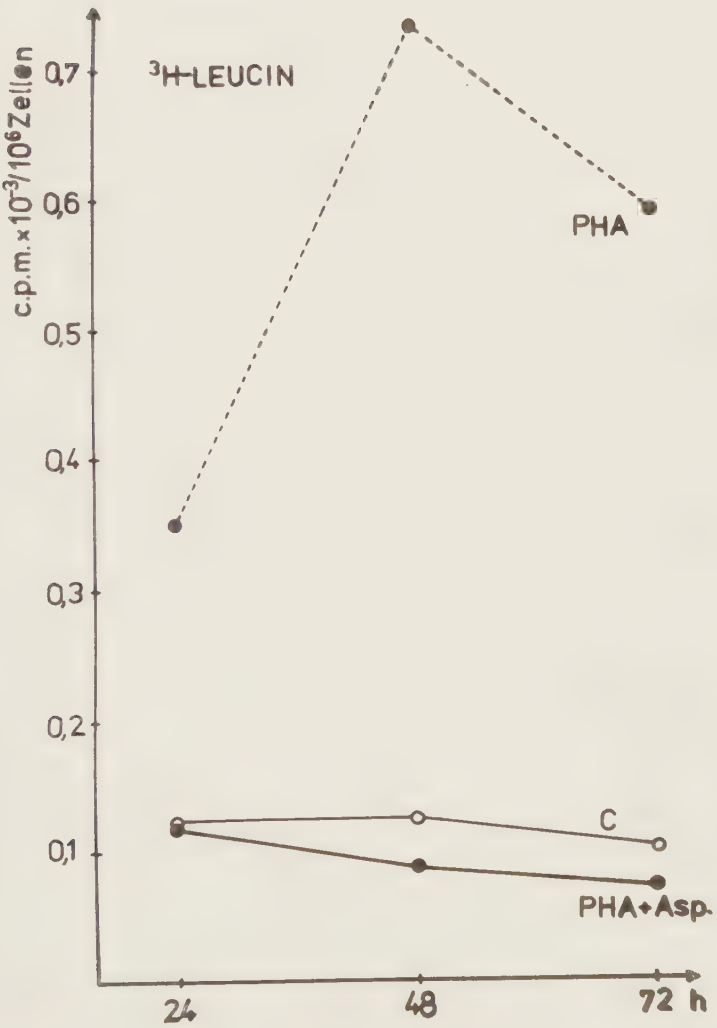
TABELLE 3

^{3}H - Leucin

Ernte nach	1 Std.	3 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
PHA	132	119	174	215	352	740	593
PHA + L-Asparaginase	94	98	170	188	117	86	71
Kontrollen	129	133	145	124	123	127	102
L-Asparaginase	127	161	132	103	99	105	117

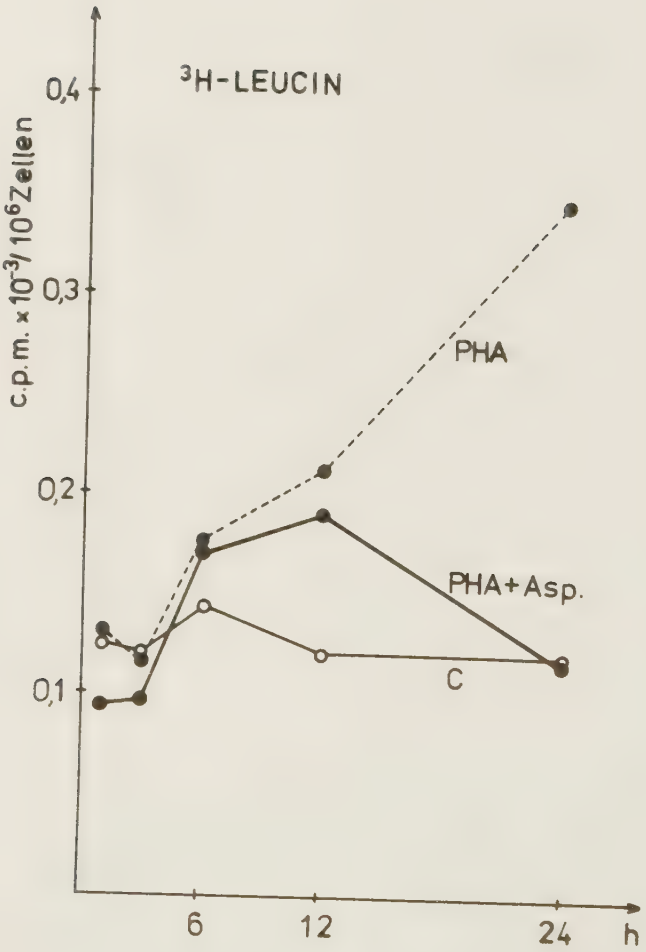
Mittelwerte der Inkorporationsraten (c.p.m. x $10^{-3}/10^{6}$ Zellen) von ^{3}H-Leucin aus 5 Versuchen; die Ernte erfolgte nach 1, 3, 6, 12, 24, 48 u 72 Std Kulturdauer

A B B. 3



Gleichzeitiger Zusatz von L-Asparaginase und PHA; die Messungen der ^{3}H-Leucin-Inkorporationsraten erfolgte nach 1,3,6,12,24,48 und 72 Stunden.

A B B. 4



Gleichzeitige Zugabe von L-Asparaginase und PHA; die Messungen der ^{3}H-Leucin-Inkorporationsraten erfolgten nach 1,3,6,12 und 24 Stunden.

die nach 48 Stunden ihren Maximalwert erreichte und nach 72 Stunden wieder abfiel. Bereits 6 Stunden nach PHA-Zusatz konnte ein deutlicher Unterschied gegenüber PHA-freien Kontrollkulturen festgestellt werden. In Kulturen, die PHA und L-Asparaginase enthielten, wurde ebenfalls nach 6 und 12 Stunden eine deutliche Zunahme der ^{3}H-Leucin-Inkorporation beobachtet. Nach 24 Stunden fielen die Einbauraten wieder ab und unterschieden sich während der weiteren Versuchsperiode nicht wesentlich von denen der PHA-freien Kontrollkulturen. Der Anstieg in PHA und L-Asparaginase inkubierten Kulturen zwischen 12 und 24 Stunden verlief parallel zu den Einbauraten der Kulturen, die allein PHA enthielten. Jedoch lagen die Inkorporationsraten nach 24 Stunden und während der weiteren Kulturperiode in PHA-Kulturen deutlich über denen, die mit PHA und L-Asparaginase behandelt wurden. In Kulturen, die lediglich L-Asparaginase enthielten, differierten die Einbauraten nicht wesentlich von denen der Kontrollkulturen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob und zu welchem Zeitpunkt L-Asparaginase auf Lymphozyten wirkt, bei denen die Inkubation mit PHA bereits vor dem Enzymzusatz begonnen wurde. Zu diesem Zweck erfolgte die Zugabe von L-Asparaginase entweder zeitgleich mit PHA oder 1, 3, 6, 12, 24 oder 48 Stunden nach Stimulationsbeginn. Die Messungen der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation fanden 24, 48 und 72 Stunden nach PHA-Zusatz statt. Die Abb. 5 und Tabelle 4 geben die Mittelwerte aus drei Versuchsreihen wieder.
Wurde die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation 24 Stunden nach PHA-Zusatz bestimmt, so unterschieden sich die Einbauraten in Kulturen, die PHA enthielten, sowie in Kulturen, denen L-Asparaginase entweder zeitgleich mit PHA oder 1, 3, 6 und 12 Stunden nach PHA zugesetzt wurde, nicht wesentlich von denen PHA-freier Kontrollkulturen.
Wurden die Kulturen 48 Stunden nach PHA-Zusatz geerntet und der ^{3}H-Thymidin-Einbau bestimmt, so wurden

TABELLE 4

Verzögerte L-Asparaginasezugabe

a) Ernte nach 24 Stunden

PHA	100				
Kontrollen	82				
L-Asparaginase Zugabe nach	0 Std.	1 Std.	3 Std.	6 Std.	12 Std.
PHA + L-Asparaginase	77	100	72	69	73

Die L-Asparaginasezugabe erfolgte 0, 1, 3, 6 und 12 Stunden nach PHA-Präinkubation.

b) Ernte nach 48 Stunden

PHA	1105					
Kontrollen	62					
L-Asparaginase Zugabe nach	0 Std.	1 Std.	3 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.
PHA + L-Asparaginase	55	47	25	54	55	224

Die L-Asparaginasezugabe erfolgte 0, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach PHA-Präinkubation

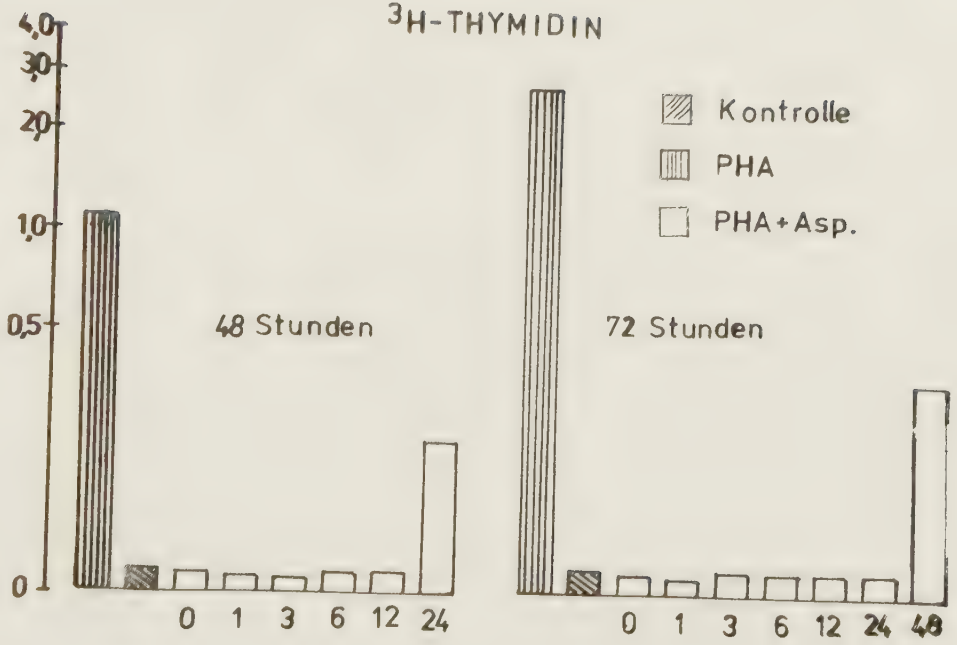
TABELLE 4

Verzögerte L-Asparaginasezugabe

c) Ernte nach 72 Stunden

PHA							
Kontrollen							
L-Asparaginase Zugabe nach	0 Std.	1 Std.	3 Std.	6 Std.	12 Std.	24 Std.	48 Std.
PHA + L-Asparaginase	53	44	57	45	46	44	352

Die L-Asparaginasezugabe erfolgte 0, 1, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach PHA-Präinkubation.



Verzögerte Zugabe von L-Asparaginase nach 0,1,3,6,12,24 bzw. 48 Stunden PHA-Präinkubation; die Ernte erfolgte nach 48 und 72 Stunden.

in PHA-Kulturen deutlich höhere Inkorporationsraten gemessen als in unstimulierten Kontrollkulturen. Gab man das Enzym 1, 3, 6 oder 12 Stunden nach PHA in die Kulturen, so wurden Einbauraten ermittelt, die sich nicht von den PHA-freien Kontrollkulturen unterschieden. Wenn jedoch das Enzym 24 Stunden nach PHA-Stimulationsbeginn zugegeben wurde, konnte zwar noch ein wesentlich geringerer Einbau von ^{3}H-Thymidin gegenüber den PHA-inkubierten Versuchsansätzen festgestellt werden; jedoch lag dieser Wert deutlich über den PHA-freien Kontrollkulturen.

Die Kulturen, die über 72 Stunden beobachtet wurden, wiesen einen wesentlichen Unterschied zwischen den PHA-freien und den mit PHA stimulierten Kulturen auf. Erfolgte der L-Asparaginase-Zusatz bis 24 Stunden nach PHA-Präinkubation, so differierten die Inkorporationsraten nicht wesentlich von denen PHA-freier Kontrollkulturen. Wurde das Enzym 48 Stunden nach der PHA-Zugabe appliziert, so lagen die Werte in diesen Kulturen deutlich höher als in Kontrollkulturen; jedoch unterschieden sich die Einbauraten gegenüber den Kulturen, die nur PHA enthielten, ebenso deutlich.

Faßt man die Ergebnisse dieser 2. Versuchsserie zusammen, so kommt man zu folgendem Schluß: In Kulturen, die über 48 Stunden beobachtet wurden, fanden sich deutlich verminderte Inkorporationsraten von ^{3}H-Thymidin, wenn die Zugabe von L-Asparaginase nicht später als 12 Stunden nach dem Zusatz von PHA erfolgte. In Kulturen, die nach 72 Stunden geerntet wurden, durfte die Zugabe von L-Asparaginase nicht später als 24 Stunden nach Beginn der PHA-Stimulation erfolgen, wenn eine maximale Inkorporationshemmung an ^{3}H-Thymidin erzielt werden sollte. Eine Einwirkungsdauer der L-Asparaginase von mehr als 24 Stunden war demnach in der Lage, die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation deutlich zu senken.

D I S K U S S I O N

In Vorversuchen, auf die nicht näher eingegangen werden soll, konnte gezeigt werden, daß mit der hier angewendeten Methode die typischen Veränderungen der mit PHA stimulierten Lymphozyten auftreten. In den mit PHA behandelten Kulturen trat eine Umwandlung ein, die vom kleinen, "schlafenden" Lymphozyt mit wolkigem Kern und schmalem Zytoplasmasaum ausging und sich über Zellen mit aufgelockertem Kern mit angedeuteten Nukleolen ("transitional cells") zum großen Blast entwickelte, der 2-3 mal so groß wie der normale Lymphozyt ist. Die Kerne dieser Zellen sind rund bis oval und das Chromatin ist stark aufgelokkert. Es entwickeln sich häufig mehrere prominente Nukleoli, das Zytoplasma ist stark basophil und weist zahlreiche Vakuolen auf. Die ersten Blasten wurden zwischen 24 und 36 Stunden gefunden und ihr Erscheinen erreichte nach 72 Stunden das Maximum (75-80%). Mitosen waren zu diesem Zeitpunkt häufig zu sehen. In PHA-freien Kulturen lag die Anzahl der Blasten während der gesamten Kulturdauer unter 1%. In Kulturen, denen PHA und L-Asparaginase zugesetzt wurde, konnte man nach 12 bis 36 Stunden vereinzelt "transitional cells" beobachten (zwischen 3,5 und 5%), jedoch typische Blasten waren während der gesamten Kulturperiode nicht zu sehen. Mitosen wurden in diesen Kulturen nicht gefunden.

Die morphologische Beurteilung ermöglicht nur einen partiellen Einblick in die Transformationsvorgänge. Exaktere Aufschlüsse über die Beeinflussung des Transformationsprozesses in Lymphozytenkulturen, z.B. durch Medikamente, können bei der Untersuchung mit radioaktiv-markierten Stoffwechselpräkursoren erwartet werden. Der mitotischen Teilung gehen zeitlich die Steigerungen der Protein- und RNA-Synthesen, die Umwandlung der Lymphozyten in große, basophile

Blasten und für die Mitose notwendige Erhöhung der DNA-Synthese voraus.
In den vorliegenden Untersuchungen wurde in einer ersten Versuchsreihe die Beeinflussung des ^{3}H-Leucin ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Thymidin-Einbaus durch das Enzym L-Asparaginase in PHA stimulierte Lymphozyten beobachtet.
In Kulturen, denen weder PHA noch L-Asparaginase zugesetzt wurde, konnte ein konstanter Basiseinbau von ^{3}H-Leucin ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Thymidin gemessen werden In PHA stimulierten Kulturen trat zunächst 6 Stunden nach Versuchsbeginn eine deutliche Steigerung der ^{3}H-Leucin-Inkorporation gegenüber den Kontrollkulturen auf Diese Steigerung erreichte nach 48 Stunden ihr Maximum und fiel nach 72 Stunden wieder ab. Der ^{3}H-Uridin-Einbau stieg in PHA-Kulturen nach 12 Stunden an erlangte nach 48 Stunden seinen Höhepht und sank nach 72 Stunden wieder ab In PHA stimulierten Zellen bei denen die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation gemessen wurde, trat zwischen 24 und 36 Stunden eine erhöhte Einbaurate auf die bis nach 72 Stunden ständig zunahm
In den Kulturen, die mit PHA und L-Asparaginase gleichzeitig behandelt wurden, konnte ein deutlicher Anstieg der ^{3}H-Leucin-Inkorporation nach 6 und 12 Stunden beobachtet werden. Jedoch unterschieden sich diese Werte nach 24 Stunden und im weiteren Verlauf der Kulturperiode nicht wesentlich von denen der Kontrollansätze. Die ^{3}H-Uridin- und ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsraten blieben während der gesamten Beobachtungszeit konstant.

Zur 2 Versuchsserie ist zu bemerken, daß nach 24 Stunden in keiner Kultur ein vermehrter ^{3}H-Thymidin-Einbau gemessen wurde. In PHA stimulierten Kulturen, die nach 48 Stunden geerntet wurden, war ein deutlicher Anstieg der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation zu beobachten. Gab man die L-Asparaginase gleichzeitig oder 1, 3, 6 oder 12 Stunden nach Kulturbeginn mit PHA zu, so wurde kein ^{3}H-Thymidin vermehrt eingebaut. 24 Stun-

den nach Kulturbeginn zugegebene L-Asparaginase (= 24 Stunden PHA-Präinkubation) und nach 48 Stunden geerntete Kulturen, ergaben eine vermehrte ^{3}H-Thymidin-Inkorporation. Diese Einbaurate lag jedoch deutlich unter den Werten der Kulturen, die allein mit PHA kultiviert wurden. Nach 72 Stunden wurde die höchste ^{3}H-Thymidin-Einbaurate dieser Versuchsreihe gemessen. Wurde L-Asparaginase gleichzeitig oder 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden nach Kulturbeginn mit PHA zugegeben, so wurde ^{3}H-Thymidin nicht vermehrt inkorporiert. 48 Stunden nach Kulturbeginn zugegebene L-Asparaginase (= 48 Stunden PHA-Präinkubation) und nach 72 Stunden geerntete Kulturen, ergaben stark erhöhte ^{3}H-Thymidin-Einbauraten, die jedoch deutlich unter denen der PHA-Kontrollansätze lagen.

Vergleicht man die Ergebnisse unserer morphologischen Versuche mit den vorliegenden Beobachtungen anderer Autoren, die sich mit der Beeinflussung der L-Asparaginase auf Lymphozytenkulturen befaßt haben so ergeben sich zahlreiche Parallelen. Astaldi et al. (2) konnten als erste Untersucher die Hemmung des Enzyms L-Asparaginase auf die PHA-induzierten Transformationsvorgänge beschreiben. Sie fanden bei gleichzeitiger Gabe von PHA und L-Asparaginase in den Kulturen nach 3 Tagen einen Abfall der Blasten auf 2,32 % der PHA-Kontrollwerte. Pienkowski et al. (46) sahen in PHA und L-Asparaginase behandelten Lymphozyten 7,5 % Blasten gegenüber 61 % aktivierten Zellen in PHA-Kulturen. Diese Feststellung ist insofern bemerkenswert, da nur diese Autoren diese verhältnismäßig hohen Blastentransformationen in PHA und L-Asparaginase inkubierten Kulturen beobachteten, während alle anderen Untersucher eine weit geringere Anzahl von Blasten fanden. Kirchner et al. (34, 35) konnten nach 72 Stunden ebenfalls eine deutliche Transformationshemmung feststellen, während PHA-Kontrollkulturen 75 % Lymphoblasten enthielten. Diese Versuchsergebnisse

wurden durch Arbeiten von Ohno et al. (45) und von Miura et al. (41) bestätigt. Wurden stimulierte Lymphozytenkulturen nach 72 Stunden mit Colchicin für 24 Stunden inkubiert, so fanden Kirchner et al. (34, 35) bei PHA-Kulturen einen Mitoseindex von durchschnittlich 14 %, während die mit PHA und L-Asparaginase behandelten Kulturen einen Mitoseindex von niemals mehr als 3 % aufwiesen. Krug et al. (36) fanden ebenfalls einen transformationshemmenden Effekt, wenn PHA und L-Asparaginase gleichzeitig den Kulturen zugesetzt wurden. Jedoch beschrieben diese Autoren vereinzelte "transitional cells". Diese Ergebnisse wurden durch unsere Untersuchungen bestätigt. Wir konnten in den mit PHA und L-Asparaginase inkubierten Kulturen nach 72 Stunden niemals mehr als 1 % Blasten auszählen. Doch fanden wir häufig "transitional cells".

Die Anzahl der Arbeiten, die sich mit dem Einbau von radioaktiv-markierten Stoffwechselpräkursoren in PHA und L-Asparaginase behandelte Lymphozyten beschäftigten, ist wesentlich geringer. Mit dem Isotop ^{3}H-Leucin, das den Ablauf des Proteinstoffwechsels angeben soll, liegen für unsere Versuchsbedingungen keine analogen Ergebnisse vor. Weiner et al (58) haben gefunden, daß in einem L-Asparagin-Mangelmedium eine deutlich reduzierte Proteinsynthese (nur 40 % gegenüber den PHA-Kontroll) abläuft. Ellem et al. (22) beobachteten eine stark herabgesetzte Einbaurate der Isotope in L-Asparagin-Mangelmedien. Auch über den ^{3}H-Uridin-Einbau in PHA-stimulierten Kulturen mit Zugabe von L-Asparaginase liegen noch keine Ergebnisse vor. Dagegen haben einige Autoren die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation in PHA und L-Asparaginase inkubierten Lymphozyten gemessen. Ohne et al. (45) fanden in diesen Kulturen eine Reduktion der Inkorporationsraten um 97,6 % gegenüber den PHA-Kontrollen. Miura et al. (41) fanden ebenfalls eine starke Transformationshemmung durch L-Asparaginase. Pienkowski et al. (46) beobachteten zwar eine deutliche Inhibition der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten, jedoch stellten sie fest, daß

die Inkorporation dieser PHA und L-Asparaginase behandelten Kulturen deutlich über den PHA-freien Kontrollansätzen lag. Dagegen fanden Krug et al. (36) in ihren autoradiographischen Versuchen, daß die Markierung der Zellkerne mit ^{3}H-Thymidin in PHA und L-Asparaginase inkubierten Kulturen sich von den Leerkulturen nicht wesentlich unterschied (beide weniger als 0 2 %). Unsere Ergebnisse bezüglich der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation decken sich mit den Beobachtungen von Ohno et al. (45), Krug et al. (36) und Miura et al. (41).

Wie eine verzögerte L-Asparaginase-Zugabe in PHA-präinkubierten Lymphozytenkulturen wirkt, haben auch mehrere Autoren untersucht. Astaldi et al. (1, 3) fanden eine maximale Hemmung der Blastogenese wenn L-Asparaginase innerhalb der ersten Stunde nach Beginn der PHA-Stimulation zugesetzt wurde Eine starke Hemmung wurde noch beobachtet, wenn die Zugabe des Enzyms bis zu 6 Stunden nach Beginn der PHA-Inkubation erfolgte.
Ein noch späterer Zusatz von L-Asparaginase ergab einen Anstieg der Blastogenese, und zwar nahm diese um so mehr zu je später das Enzym appliziert wurde. Kirchner et al. (34, 35) ermittelten, daß durch Gabe von L-Asparaginase gleichzeitig und 12 Stunden nach PHA-Inkubation die Transformation vollständig unterdrückt werden konnte, daß andererseits aber ein späterer Enzym-Zusatz die Blastentransformation immer weniger hemmte. Krug et al. (36) fanden dagegen nach 72stündiger PHA-Präinkubation noch eine große Sensibilität gegenüber L-Asparaginase. Es trat eine deutliche Abnahme der Blastenzahl in PHA-Kulturen mit L-Asparaginase-Behandlung gegenüber den Zellen auf, die mit PHA allein kultiviert wurden. Durch Bestimmung des Mitoseindex' bei Kulturen, denen nach PHA-Stimulation verzögert L-Asparaginase zugesetzt wurde, konnte Dartnall (19) einen Zeitpunkt bestimmen, bis zu dem L-Asparaginase den Transformationsvorgang vollkommen hemmte, nämlich bis 26-28 Stunden

nach PHA-Inkubation. Später gegebene L-Asparaginase konnte nur noch eine teilweise Hemmung der Transformation erzielen.

Über Einbauraten von ^{3}H-Thymidin in PHA prästimulierte Zellen mit verzögertem L-Asparaginase-Zusatz liegen nur wenige Untersuchungen vor. Ohno et al. (45) ermittelten nach 5 Tagen die ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Kulturen, denen verspätet das Enzym zugesetzt worden war und kamen zu dem Ergebnis, daß die Inkorporation um so mehr anstieg, je länger PHA vor Zugabe der L-Asparaginase in den Lymphozytenkulturen vorhanden war. Wir untersuchten in 24, 48 und 72 Stunden-Kulturen die ^{3}H-Thymidin-Inkorporation bei verzögerter L-Asparaginase-Zugabe und stellten fest, daß ein Zusatz des Enzyms zwischen 0 und 24 Stunden nach PHA-Stimulationsbeginn die Einbauraten im Gegensatz zu PHA-Kontrollen nicht anstiegen. Die Werte waren mit denen unstimulierter Kulturen zu vergleichen. Jedoch fanden wir bei einem 24stündig verzögertem L-Asparaginase-Zusatz, wenn die Zellen nach 48 Stunden geerntet wurden, nur eine teilweise Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus. Der Wert lag deutlich über den unstimulierten Kontrollkulturen, jedoch auch ebenso deutlich unter dem PHA-Kontrollansatz. Bei 48stündig verzögerter L-Asparaginase-Applikation beobachteten wir in Kulturen nach 72 Stunden ebenfalls nur eine teilweise Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation. Auch dieser Wert lag deutlich über den Leerkulturen und ebenso klar unter den PHA-Kontrollen. Somit stimmt unser Ergebnis mit den Beobachtungen von Ohno et al. (45) überein. Auch mit anderen Isotopen wurde die verzögerte L-Asparaginase-Zugabe untersucht. So ermittelten Krug et al. (36) in ihren Versuchen mit radioaktiv-markiertem Valin nach 72 Stunden PHA-Vorbehandlung der Lymphozyten und anschließender L-Asparaginase-Zugabe noch eine hohe Sensibilität der stimulierten Zellen (die Inkorporation betrug nur 25 % der PHA-Kontrollen). PHA-Präinkubation und späterer L-Asparaginase-Zusatz wurden von Miura et al. (41) mit ^{3}H-Uridin untersucht.

Diese Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß der Anstieg der Inkorporationsrate kontinuierlich mit der Größe des Zeitraumes wuchs, zu dem L-Asparaginase verspätet zugesetzt wurde. Torelli et al. (56) beobachteten die Wirkung von L-Asparaginase auf 24-stündig mit PHA vorbehandelte Lymphozyten anhand der ^{3}H-Uridin-Inkorporation. Sie fanden nach 30minütiger L-Asparaginase-Behandlung schon eine herabgesetzte ^{3}H-Uridin-Inkorporation. Nach einer Stunde L-Asparaginase-Inkubation betrug die Einbaurate nur noch 50 % der PHA-Kontrollen, während nach 2 Stunden kein weiterer Abfall zu verzeichnen war. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine verzögerte L-Asparaginase-Applikation bis zu einem bestimmten Zeitpunkt die PHA-induzierte Transformation vollkommen hemmen kann. Erfolgt jedoch der Enzym-Zusatz noch später, so findet nur noch eine partielle Hemmung des Isotop-Einbaus statt.

Alle bisher vorliegenden Mitteilungen, in denen über die Einwirkung von L-Asparaginase auf Lymphozytenkulturen berichtet wurde, stimmen darin überein, daß die PHA-induzierte Transformation der Lymphozyten durch dieses Enzym verhindert wird. Welche Möglichkeiten bestehen, um diese Hemmung der Blastogenese durch L-Asparaginase zu erklären?
Die einfachste Vorstellung zur Wirkung des Enzyms auf die Lymphozyten wäre ein zytotoxisches Geschehen. Schrek et al. (51) untersuchten die Toxizität bei normalen und leukämischen Zellen. Normale menschliche Lymphozyten wurden bei einer Dosis von 10 I.E./ml L-Asparaginase wenig in ihrer Vitalität betroffen, während leukämische Zellen zugrunde gingen. Da nach Krug et al. (36) stimulierte Lymphozyten ähnlich empfindlich wie leukämische Zellen reagieren, wäre eine zytotoxische Wirkung nicht ausgeschlossen. Auch Dartnall et al. (18) diskutierten einen toxischen Effekt. Jedoch werden diese Befunde durch die Arbeit von Ohno et al. (45) widerlegt. Denn nach 72stündiger Asparaginase-Vorbehandlung der Lymphozyten und spä-

terer PHA-Stimulation konnte keine Differenz der ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsrate gegenüber stimulierten Zellen ohne L-Asparaginase-Behandlung festgestellt werden. Auch die in vivo Versuche (Astaldi: 3; Fink: 24) ergaben, daß eine 24stündige L-Asparaginase-Behandlung keinen toxischen Effekt auf die Lymphozyten hatte. Denn bei anschließender Inkubation mit L-Asparaginase-freiem homologem Serum fand eine normale Lymphozytentransformation statt. Ohno et al. (45) und Miura et al. (41) fanden in zytologischen Ausstrichen keinen Anhalt dafür, daß die Vitalität der Zellen durch L-Asparaginase beeinträchtigt würde. Durch evtl. Verunreinigungen bedingte toxische Wirkungen schlossen Ohno et al. (45) und Krug et al. (36) aus, da sie mit hochgereinigter L-Asparaginase arbeiteten. Ohno et al. (45) zeigten, daß auch der bei der Spaltung des Asparagin entstandene Ammoniak keine toxische Wirkung auf die Lymphozyten haben konnte. Somit ist eine toxische Ursache der Hemmung unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit, den hemmenden Effekt der L-Asparaginase auf PHA stimulierte Lymphozyten zu erklären, wäre ein Antagonismus von PHA und L-Asparaginase. Zu diskutieren wäre eine Inaktivierung von PHA durch das Enzym im Medium bzw. im Serum, bevor die Initialvorgänge der Stimulation eintreten. Auch eine kompetitive Hemmung der PHA-Anlagerung durch L-Asparaginase an die Membran der Lymphozyten ist denkbar. Gegen diese beiden Möglichkeiten sprechen Versuchsreihen von Ferfoglia et al. (23) und Burgio et al. (14), in denen PHA im Überschuß in die Kulturen gegeben wurde, ohne daß dadurch die Hemmwirkung aufgehoben werden konnte. Eine direkte Wirkung von L-Asparaginase auf PHA ist somit auszuschließen. Auch die Tatsache, daß L-Asparaginase nicht nur allein die durch PHA-stimulierten Zellen, sondern auch die durch spezifische Antigene hervorgerufene Transformation der Lymphozyten hemmt, macht einen Antagonismus zwischen PHA und L-Asparaginase unwahrscheinlich.

Die Hemmung der L-Asparaginase könnte auch dadurch erklärt werden, daß das Enzym den Membranstoffwechsel beeinflußt. Hierdurch könnten die für die PHA-induzierte Transformation notwendigen Stoffwechselvorgänge verhindert werden. Lajolo et al. (37) wiesen eine Änderung des Membranpotentials nach L-Asparaginase-Applikation nach und fanden eine Herabsetzung der elektrophoretischen Mobilität der Lymphozyten durch das Enzym. Ohno et al. (45) diskutierten ebenfalls eine Membranwirkung und nehmen an, daß L-Asparaginase die Anlagerung oder Aufnahme in die Zelle reversibel hemmt. Sie konnten zeigen, daß nach 72stündiger L-Asparaginase-Vorbehandlung eine normale PHA-induzierte Transformation der Lymphozyten stattfand, wenn das Enzym durch mehrere Waschvorgänge aus den Kulturen eliminiert wurde.

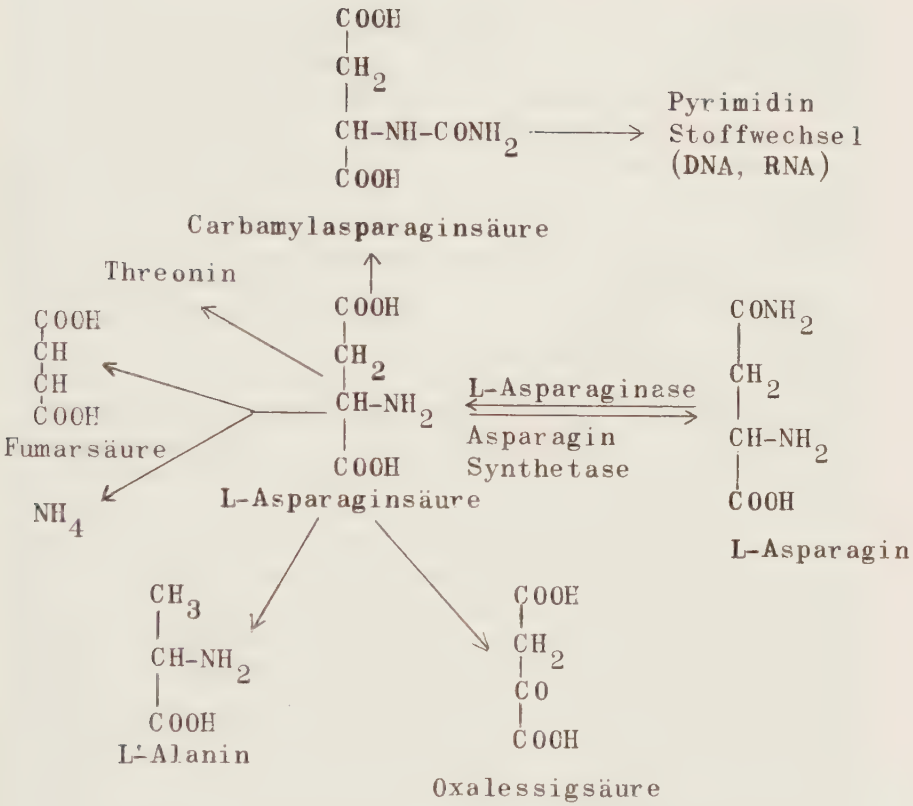
Gegen eine alleinige Wirkung von L-Asparaginase auf die Zellmembran sprechen vor allem unsere Beobachtungen Es wurde in unseren Versuchen ein initialer Anstieg der ^{3}H-Leucin-Inkorporation in PHA und L-Asparaginase behandelten Kulturen festgestellt. Auch das Auftreten der "transitional cells" in den Ausstrichen der Kulturen denen PHA und L-Asparaginase zugesetzt wurde, muß als Argument gegen eine ausschließliche Membranwirkung des Enzyms angesehen werden.
Unsere Befunde lassen vermuten, daß die initialen Vorgänge der Transformation trotz Gabe von L-Asparaginase ablaufen, daß aber nach 12 Stunden der Umwandlungsvorgang gestoppt bzw. rückgängig gemacht wird. Zur Erklärung dieser Geschehen sollen kurz die Vorstellungen erwähnt werden, die man sich von den Vorgängen bei der PHA induzierten Transformation im Lymphozyt macht. Hirschhorn et al (26) stellten die "Derepressor-Theorie" zur Diskussion: der kleine Lymphozyt befindet sich in einer Ruhepause, in der durch einen Repressor die Nukleinsäureproduktion auf ein Minimum gesenkt worden ist. Wird die Lysosomenmembran, so Hirschhorns Theorie, von PHA destabilisiert, so gerät die Nukleinsäureproduktion durch

Enzymeinwirkung (z.B. Ribonuklease) ins Ungleichgewicht und eine Genaktivierung ist die Folge. Diese Theorie läßt sich gut mit den Befunden von Cooper et al. (16) in Einklang bringen. Sie fanden während der ersten 30 Minuten nach PHA-Zusatz einen Abfall der gesamten RNA (nach Hirschhorns Theorie bedingt durch die freigewordenen Rebonuklease im Zytoplasma). Diesem Abfall der RNA schließt sich eine exponentielle Steigerung der ribosomalen RNA an. Die ribosomalen RNAs scheinen eine entscheidende Rolle bei der Transformation der Lymphozyten zu spielen. Sie entwicklen sich aus der 45 S Sedimentierungsfraktion und diese teilt sich auf in die 18 S und 28 S r-RNA. Während im Ruhestadium nur relativ wenig 28 S und fast keine 18 S r-RNA im Sedimentationsdiagramm zu finden sind, steigen diese beiden ribosomalen RNAs in PHA stimulierten Kulturen nach 6 Stunden exzessiv an (Rubin; 48; Kay; 30; Cooper; 17). Im Ruhestadium sind nur 2-4 % der Gesamt-RNA ribosomal, in der Proliferationsphase wird dagegen ein Anteil von 15 % gefunden (Rubin et al.: 50). Rubin (49) sieht die ribosomale Aggregation als ein Zeichen des Wachstums der PHA stimulierten Lymphozyten an. Cooper et al. (16) machten die Beobachtung, daß die schnell synthetisierte RNA in den ersten Stunden nicht ribosomal war, sondern zwischen 6 S und 20S im Diagramm sedimentierten, d.h. der Fraktion der messenger-RNA entspricht. Torelli et al. (55) fanden in ihren Versuchen, daß die schnell synthetisierte RNA hauptsächlich nukleärer Natur war. Diese Befunde zeigen deutlich, daß der RNA-Synthese und im besonderen Maße der ribosomalen RNA eine Schlüsselstellung bei der Transformation der Lymphozyten zukommt.

Torelli et al. (56) fanden in Kulturen, die außer PHA auch L-Asparaginase enthielten, ein Ausbleiben der Synthese von 45 S, 48 S und 18 S RNA. Dieser Befund kann mit einer Hemmung oder Verzögerung der Gen-Transkription im Anfangsstadium der Stimulation erklärt werden (Rubin; 48; Ellem; 22; Darzynkiewiecz; 20). In Gegenwart von PHA und L-Asparaginase gleicht

das Sedimentationsdiagramm dem unstimulierten Lymphozyten. Bei gleichzeitiger Gabe von L-Asparaginase und PHA hat das Enzym den Effekt, daß der Zustand dieser Zellen dem des ruhenden Lymphozyten angenähert wird. Eine Steigerung der ribosomalen Aggregation tritt nicht ein und hierdurch wird der Transformationsvorgang unterdrückt.
In diesem Zusammenhang sind auch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Voigt et al. (57) bei leukämischen Zellen nach Behandlung mit L-Asparaginase von Interesse. Es konnte eine Herabsetzung der ribosomalen Strukturen gezeigt werden. Diesen Befunden folgend bilden sich die normalerweise im Elektronenmikroskop vermehrt gefundenen Ribosomen, Polysomen und Mitochondrien (Tanaka; 54) bei einer L-Asparaginase-Behandlung nicht aus.

Da eine alleinige Membranwirkung oder ein zytotoxischer Vorgang als Wirkungsmechanismus der L-Asparaginase ausgeschlossen wurden, müssen andere Geschehen für die Hemmung des Enzyms auf die Transformation der Lymphozyten diskutiert werden. Es könnte, im Sinne der Hirschhorn-Theorie, eine Stabilisierung der Lysosomenmembran in Betracht gezogen werden, so daß PHA keine Einwanderung der Ribonukleasen ins Zytoplasma bewirken könnte. Hiergegen jedoch sprechen unsere Beobachtungen, daß initiale Stoffwechselvorgänge ablaufen.
Die Hemmung der Lymphozytentransformation könnte auf physiologische Wirkungen des Enzyms L-Asparaginase zurückgeführt werden. Die Stellung des Enzyms ist aus nachstehendem Schema zu ersehen:



L-Asparagin im Stoffwechsel
(Schema nach K. Bauer)

L-Asparaginase katalysiert die Umwandlung von L-Asparagin in L-Asparaginsäure und Ammoniak. Das Enzym erzeugt also einen L-Asparaginmangel im Medium bzw. Serum. L-Asparaginase resistente Zellen sind in der Lage, das für den Zellstoffwechsel benötigte L-Asparagin über ein adaptives Enzym selbst zu synthetisieren, während L-Asparaginase-sensible Zellen nicht über ausreichende Mengen von Asparagin-Synthetase verfügen. In Lymphozyten sind sehr wahrscheinlich nur geringe Mengen oder überhaupt keine Asparagin-Synthetase enthalten. Die Aminosäure

Asparagin ist für die Lebensfähigkeit ruhender Lymphozyten nicht essentiell und gehen in Gegenwart eines Asparaginmangels nicht zugrunde. Proliferierende Lymphozyten dagegen benötigen Asparagin. Ein Asparaginmangel muß demnach zu einer Proliferationshemmung führen. Astaldi (3) und Fink (24) haben L-Asparaginase in vivo gegeben und 24 Stunden später Lymphozytenkulturen durchgeführt. Es ist dann zu einer kompletten Hemmung der Transformation bei Stimulation mit PHA gekommen, wenn autologes Serum verwendet worden ist. Bei Inkubation von homologem Serum fand eine normale Lymphozytentransformation statt. Diese Befunde wie auch die Ergebnisse von Ohno et al. (45), die nach 72stündiger Vorbehandlung mit L-Asparaginase und späterer, alleiniger PHA-Stimulation normale Transformationsvorgänge beobachteten, sprechen dafür, daß ein exogener Asparaginmangel zu einer Transformationshemmung führt. Von Weiner et al. (58) und Ellem et al. (22) ist berichtet worden, daß nicht nur mit L-Asparaginase behandelte Kulturen, sondern auch Lymphozyten, die in einem Asparaginmangelmedium kultiviert wurden, nach PHA-Stimulation keine Transformation durchliefen. Diese Beobachtung beweist, daß nicht das Enzym L-Asparaginase an sich die Transformationshemmung hervorruft, sondern daß der durch das Enzym herbeigeführte Asparaginmangelzustand eine Blastogenese der Lymphozyten verhindert. Danach müßte die Gabe von Asparagin im Überschuß bei PHA und L-Asparaginase inkubierten Zellen die Hemmung entweder ganz oder teilweise aufheben. Hierzu finden sich widersprüchliche Beobachtungen in der Literatur: Während Lazarus (39), Kirchner et al. (34, 35), Krug et al. (36) keine Aufhebung der Hemmung durch zusätzliche Gabe von Asparagin fanden, konnten Ohno et al. (45), Burgio et al. (14) und Miura et al. (41) eine partielle Abnahme der hemmenden Wirkung beobachten. Diese gegensätzlichen Befunde bedürfen der weiteren Klärung. Neben der L-Asparaginase wirkenden Komponente hat das Enzym L-Asparaginase noch geringe Glutaminaseaktivität. Um auszuschließen, daß dieser Faktor

die Hemmung der Lymphozytentransformation bewirkt, haben Dartnall (19), Krug et al. (36) und Ohno et al. (45) den Kulturen Glutamin zugesetzt und dabei keine wesentliche Änderung der Hemmung beobachtet.

Berücksichtigt man die vorangegangenen Ausführungen, so sind unsere Ergebnisse folgendermaßen zu interpretieren:
Die Lymphozyten werden durch PHA unbeschadet der L-Asparaginase-Zugabe zu einer vermehrten Proteinsynthese in den ersten 12 bis 24 Stunden angeregt. Ob in dieser Phase eventuell Asparagin aus dem "intrazellulären pool" zur Verfügung steht oder ob zu diesem Zeitpunkt eine Proteinsynthese ohne die Aminosäure Asparagin stattfindet, kann nicht entschieden werden. Da jedoch ein exogener Asparaginmangel herrscht, erfolgt kein Aufbau der zur Transformation notwendigen ribosomalen Strukturen, da der Bedarf an der Aminosäure Asparagin aus dem "extrazellulären pool" nicht gedeckt werden kann. Hierdurch wird der Transformationsvorgang gestoppt.

Kay et al. (28, 29) fanden bei der Behandlung von Lymphozytenkulturen mit Actinomycin ebenfalls eine anfängliche Steigerung der Proteinsynthese, die genau wie in unseren Versuchen nach 24 Stunden wieder abfiel. Veränderungen der RNA- und DNA-Synthese in PHA und Actinomycin inkubierten Kulturen konnten nicht gezeigt werden. Diese Übereinstimmung der Versuchsreihen lassen darauf schließen, daß die Proteinsynthese nach einer anfänglichen Steigerung durch L-Asparaginase bzw. Actinomycin blockiert wird. Zu den darauffolgenden Stoffwechselschritten, zu denen ein Anstieg der RNA- und DNA-Synthese gehören, kann es nicht kommen, da die Voraussetzungen (= eine gesteigerte, asparaginhaltige Proteinsynthese) nicht gegeben sind.
Diese Interpretation wird auch durch die Beobachtungen unserer 2. Versuchsreihe mit verspäteter Zugabe von L-Asparaginase zu PHA stimulierter Kulturen gestützt. Die Hemmung der Transformation wurde teil-

weise aufgehoben, wenn das Enzym 24 Stunden bzw 48 Stunden nach PHA-Stimulation appliziert wurde. Der Mechanismus dieser Resistenz gegen die L-Asparaginase ist noch unbekannt. Eine Erklärung wäre, daß stimulierte Lymphozyten während der Zeit der PHA-Präinkubation soviel Asparagin inkorporiert und eingebaut haben, daß die L-Asparaginase-Zugabe keinen Asparagin-Mangelzustand hervorrufen kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die Aminosäure Asparagin nur zu Beginn oder während einer sensiblen Phase der Blastogenese benötigt wird. Aufgrund dieser Annahme kann eine gleichzeitige Gabe von L-Asparaginase und PHA die Transformation hemmen, ein verspäteter Zusatz jedoch nur noch eine teilweise Blockierung bewirken. Von unseren Versuchen ausgehend muß diese Asparagin-sensible Phase zwischen 0 und 24 Stunden liegen, denn eine bis 24stündig verspätete Zugabe von L-Asparaginase zu PHA-stimulierten Lymphozyten bewirkt noch eine absolute Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus. Hierzu ist eine Versuchsreihe von Ohno et al. (45) von Interesse, die bei gleichzeitiger Gabe einer bestimmten Menge der Aminosäure Asparagin mit dem Enzym L-Asparaginase zu Kulturbeginn eine teilweise oder komplette Aufhebung des hemmenden Effekts erreichten. Wurde jedoch dieselbe Menge Asparagin nicht gleichzeitig, sondern auf 5 Tage verteilt verabreicht, so war die Wirkung der Asparagingabe minimal. Diese Befunde sprechen für eine Asparagin-sensible Phase zu Beginn der Transformationsvorgänge, die durch einen absoluten oder partiellen Asparaginmangel unterdrückt werden. Dartnall (19) stellte anhand von Mitosebeobachtungen fest, daß dieser Zeitpunkt zwischen 26 und 28 Stunden lag. Erfolgt die Zugabe nach dieser Asparagin-sensiblen Phase, so wird die Transformation nicht mehr gehemmt, erkennbar an einer Zunahme der DNA-Synthese.
Ein interessanter Befund, der sich aus unseren Versuchen ergibt, ist die Beobachtung, daß der Zusatz von L-Asparaginase nach 24 Stunden PHA-Präinkubation nach 48 Stunden geerntet, eine eindeutig höhere

^{3}H-Thymidin-Einbaurate als die der Kontrollen bedingt, während der vergleichbare Wert bei der Ernte nach 72 Stunden nicht angestiegen ist. Dieser Vorgang ist noch ungeklärt. Jedoch könnte die nur 24 Stunden längere Inkubation mit L-Asparaginase eine schon vorhandene Transformation gestoppt oder rückgängig gemacht haben. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse von Krug et al. (36), Miura et al (41) und Torelli et al (56), die bei PHA-Präinkubation bis zu 72 Stunden noch eine starke Sensibilität der Blasten zeigen konnten.

Zusammenfassend können die am Anfang gestellten Fragen folgendermaßen beantwortet werden:

1) Die gleichzeitige Zugabe von PHA und L-Asparaginase in die Lymphozytenkulturen verminderte die Inkorporationsraten von ^{3}H-Leucin, ^{3}H-Uridin und ^{3}H-Thymidin nach 24-72 Stunden so stark, daß sich diese Werte nicht von den Aktivitäten der PHA-freien Kontrollkulturen unterschieden. Diese Hemmung der Transformation ist sehr wahrscheinlich auf eine Blockierung der Proteinsynthese durch einen von dem Enzym L-Asparaginase verursachten exogenen Asparaginmangel zurückzuführen.

2) Auch die Behandlung bereits PHA-stimulierter Lymphozyten mit L-Asparaginase vermochte den ^{3}H-Thymidin-Einbau deutlich zu hemmen, wenn der Enzymzusatz in Kulturen, die nach 48 Stunden abgebrochen wurden, 12 Stunden nach Versuchsbeginn und in Kulturen, die nach 72 Stunden geerntet wurden, 24 Stunden nach Zugabe von PHA erfolgte. Dagegen war bei einer Zugabe von L-Asparaginase, die das Intervall zwischen der Enzymapplikation und der Ernte der Kultur auf 24 Stunden reduzierte, der ^{3}H-Thymidin-Einbau gegenüber PHA-freien Kontrollansätzen deutlich gesteigert, so daß nur noch eine teilweise Hemmung der Transformation durch L-Asparaginase bewirkt wurde.

Da die hemmende Wirkung des Enzyms L-Asparaginase sich nicht nur auf PHA-stimulierte Lymphozytenkulturen beschränkt, sondern auch auf durch spezifische Antigene induzierte Transformationen wirkt, darf die L-Asparaginase als echtes immunosuppressives Therapeutikum angesehen werden. Seine Wirkung besteht in der Proliferationshemmung der Zellen, deren Vitalität dabei nicht gemindert wird. Damit ist die L-Asparaginase zu einem ganz neuartigen Immunosuppressivum geworden, das antigensensible Zellen in Gegenwart des spezifischen Antigens in ihrer Proliferation hemmt, ruhende Zellen jedoch nicht beeinflußt. Welche Schlüsse für die klinische Anwendung der L-Asparaginase als Immunosuppressivum sind aufgrund dieser Versuche erlaubt?
Für die Anwendung von L-Asparaginase als immunosuppressives Medikament bietet sich in erster Linie das Gebiet der Transplantation an, denn in Gegenwart des Enzyms und den spezifischen Antigenen werden immunologische Primärreaktionen vollständig unterdrückt Wegen der geringen Myelotoxizität wäre ein Einsatz von L-Asparaginase bei Knochenmarktransplantationen gerechtfertigt. Eine graft-versus-host Reaktion kann durch L-Asparaginase unterdrückt werden, wenn der Empfänger mit dem Enzym vorbehandelt oder wenn L-Asparaginase gemeinsam mit dem Inokulum verabreicht würde.

Obwohl sich die in das Enzym L-Asparaginase gesetzten Erwartungen eines spezifisch wirkenden Zytostatikum bei menschlichen Leukämien und soliden Tumoren nicht erfüllt haben, zeichnen sich für das Enzym wegen seiner neuartigen Wirkung auf dem Gebiet der Immunosuppression neue Anwendungsgebiete in der klinischen Medizin ab.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Astaldi,A.,jr.,Burgio,G.R.Krc,I.,Genova,R., Astaldi,G.
   Inhibition of PHA-Response by L-Asparaginase
   Haematologia 3(4),1969,395-399
2. Astaldi,G.,Burgio,G.R.,Krc,I.,Genova,R., Astaldi,A.,jr.
   L-Asparaginase and Blastogenesis
   Lancet I,1969,423
3. Astaldi,G.,Burgio.G.R.,Biscatti,G.,Astaldi,A.jr., Ferfoglia,L.
   L-Asparaginase and Blastogenesis
   Lancet II 1969,643
4. Astaldi,G.,Eridani,S.,Ponti G B.,Valentini,R., Giangrande,A.
   Influence of Antiblastic Agents applied either in vivo or in vitro on Human Lymphocytes Transformation in Cell Culture
   Blut,Bd.XIX,1969,8-16
5. Astaldi,G.,Micu,D.,Astaldi,A.jr.,Burgio,G.R.
   Immunosuppressive Action of L-Asparaginase
   Lancet II,1969,1357
6. Adamson,R.H.,Fabro,S.
   Embryotoxic effects of L-Asparaginase
   Nature (London),218,1968,1164
7. Bauer,K. Zur Biochemie der L-Asparaginase
   Med.Klinik 64,1969,9-12
8. Becker,F.F.,Broome,J.D.
   L-Asparaginase: Inhibition of early mitosis in regenerating rat liver
   Science 156,1967,1603
9. Begemann,H. Behandlung mit L-Asparaginase bei akuten Leukämien, - Kongress für Chemo-u. Immuno-Therapie der Leukosen und malignen Lymphone, Wien, 24.-26.3.1969
10. Bertelli,A.,Donati,L.,Trabucchi,E.jr.
    Prolonged survival of allo-and xeno-grafts of skin by means of an antitumoral compound: L-Asparaginase
    Arch.it.Pathol.Tumori 11,1968,475

11. Broome J.D Evidence that the L-Asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects
a. Nature (London) 1961,1114
b. J.Exp.Med.118,1963,99-121
12. Burchenal,J.H.
Med.Tribune 9,No.76,1968,126
13. Burchenal,J.H.,Karnafsky,Murphy,M.L.,Oettgen,H.F.
Effects of L-Asparaginase on Leukemias and other neoplasms
XIIth Congr.Internat.Soc.Hemat.,New York 1968
14. Burgio,G.R.,Astaldi A.jr.,Kre,I.,Micu,D.,Astaldi,G.
L-Asparaginase and Inhibition of the Lymphocyte immune Reaction
Il Farmaco, Feb.,1970,85-95
15. Clementi,A. La Désamination enzymatique de l-asparagine chez les différentes espèces animales et la signifaction physiologique de sa présence dans l'organisme
Arch.int.Physiol.19,1922,369
16. Cooper,H.L.,Rubin,A.D.
Synthesis of nonribosomal RNA by lymphocytes: A Response to PHA-Treatment
Science 152,1966,516-518
17. Cooper,H.L. Ribonucleic acid metabolism in lymphocytes stimulated by PHA
J.biol.Chem.243,1968,34-43
18. Dartnall,I.,Baikie,A.G.
Lancet I,1969,1098
19. Dartnall,I. L-Asparaginase and Blastogenesis
Lancet II,1969,1357
20. Darzynkiewicz,Z.,Pienkowski,M.
Effect of Prednisolon on RNA-Synthesis in Human Lymphocytes Stimulated by PHA
Exptl.Cell Research 54,289-292
21. Dolwy,W.C.,Henson,D.,Cornet,J.,Sellin,H.
Toxic and antineoplastic effects of L-Asparaginase
Cancer (Philad.)19,1966,1813

22 Ellem,E.A.O.,Fabrizio,A M.,Lackson,L
The Dependence of DNA- and RNA-Synthesis on Protein-Synthesis in L-Asparaginase-treated Lymphoma Cells
Cancer Research 30,1970,515-527

23. Ferfoglia,L.,Astaldi,A jr.,Krc,I.,Biscatti,G
V^th Congress of the Asian and Pacific Society of Hematology,Sept.1 -6 ,1969, Istanbul,Turkey

24. Fink,U ,Begemann,H
Clinical studies with L-Asparaginase in dermatomyositis
Recent Results in Cancer Res.33,1970,329

25 Hill,J.M. L-Asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms
J.Amer.med.Ass.202,1967

26. Hirschhorn,K.,Hirschhorn,R.
Hypothesis of Lysosomes in the Lymphocyte Response
Lacet I,1965,1046

27 Hobik,H P Der Einfluß immunosuppressiver Agentien auf die Graft-versus-Host-Reaktion in der Maus
Organtransplantation, Immunologie und Klinik S.269, Schattauer Verl.,Stuttgart 1969

28. Kay,J.E.,Leventhal,B.G.,Cooper,H.L.
Effects of Inhibition of Ribosomal RNA-Synthesis on the Stimulation of Lymphocytes by PHA
Exptl.Cell Research 54(1969),94-100

29. Kay,J.E. Effect of Actinomycin on Synthesis by Lymphocytes
Nature 215,1967,77

30. Kay,J.E. Early Effects of PHA on Lymphocyte-RNA-Synthesis European J Biochem.4,1968,225-32

31 Khan,A.,Hill,J.M.,Adachi,M.
L-Asparaginase in experimental autoimmune disease: inhibition of allergic encephalomyelitis
J.Immunol.105,1970,256

32. Khan,A.,Hill,J.
Suppression of skin hypersensitivity and antibody-formation by L-Asparaginase
J.Immunol.104,1970,679

33. Kidd,J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum, - J.exp.Med.98,1953,565-583

34. Kirchner,H.,Bauer,S.
Wirkung von L-Asparaginase aus E.coli auf die Stimulation von Lymphozytenkulturen
Acta Haemat.,1970,210-218

35. Kirchner,H.,Bauer,S.
Wirkung von L-Asparaginase aus E.coli auf PHA-stimulierte Lymphozytenkulturen
Klin.Wschr.,1970,50-51

36. Krug,U.,Ehrhart,H.
Die Wirkung des Enzyms L-Asparaginase auf PHA-stimulierte Lymphozyten in vitro.
Aus dem Institut für Hämatologie der G.S.F., Assoziation mit Euratom, München

37. Lajolo,D.,Astaldi,A.,Pecco,P.,Bert,G.,Astaldi,G.
Electrophoretical mobility of human lymphocytes in presence of E.coli L-Asparaginase
Exptl.Cell Res.60,1970,458-59

38. Lauenstein,K.,Grundmann,E.,Hobik,H.P.,Madaus,W.P.
Experimental immunosuppression with L-Asparaginase
Recent Results in Cancer Research 33,170-173
Springer Heidelberg 1970

39. Lazarus,H.,McCoy,T.A.,Farber,S.,Barell,E.F., Foley,G.E.
Nutritional Requirements of Human leukemic cells, - Exptl.Cell Res.57,1969,134-138

40. Mashburn,L.T.,Wristen,J.C.
Tumor inhibitory effect of L-Asparaginase from E.c., - Arch.Biochem.105,1964,451

41. Miura,M.,Hirano,M.,Kakzawa,K.,Morita,A.,Uetani,T., Yamada,K.,
Inhibitory Effect of L-Asparaginase in Lymphocyte Transformation by PHA
Cancer Research Vol.30,1970,768-772

42. Muller-Bérat: Immunosuppressive Action of L-Asparaginase studied by means of the localized Haemolysis in Gel Assay
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 77,1969,750-752

43. Oettgen,H.F.: Inhibition of leukemias in man by L-Asparaginase
Cancer Res. 27,1967,2619

44. Oettgen,H.F.,Schulten,H.K.
Hemmung maligner Neoplasien des Menschen durch L-Asparaginase
Klin.Wschr.47,1969,65-71

45. Ohno,R.,Hersh,E.M.
The Inhibition of Lymphocyte Blastgenesis by L-Asparaginase
Blood,Vol.35,1970,250-262

46. Pienkowski,M.,Wlodarski,K.,Ostrowski,K.,Hay,M., Kaczurba,E.,Witwicki,J.,Zakrzuwski,K.
Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences Cl.II Vol.XVIII No 7,1970
Série des sciences biologiques
Published in August 1970

47. Prager,M.D.,Derr,I.
Inhinbition of primary antibody response by E.coli L-Asparaginase
Nature 225,1970,952

48. Rubin,A.D. Ribosome Biosynthesis in Cultured Lymphocytes: II. The Role of Ribosomal RNA-Production in the Maintenance of Lymphocyte Growth
Blood,Vol.35,No.5,1970,708-720

49. Rubin,A.D. Possible Control of Lymphocyte Growth at the Level of Ribosome Assembly
Nature,Vol.220,1968,196-197

50. Rubin,A.D.,Johnson,L.J.,Brown,S.M.
Lymphocyte Proliveration and Lymphoproliferative Disorders
Progr.exp.Tumor Res.Vol.13,1970,135-180
(Karger,Basel/München/New York)

51. Schrek,R.,Dolowy,W.C.,Ammeraal,R.L.
L-Asparaginase: Toxicity to normal and leukemic human lymphocytes
Science 155,1967 329
52. Schwartz,R.S.
Immunosuppression by L-Asparaginase
Nature 224,1969 275
53. Schulten,H.K.,Giraldo G. Boyse,E.M.,Oettgen,H.F
Immunosuppressive action of L-Asparaginase
Lancet II,1969 644
54. Tanaka Y Epstein,L.B .Brecher G.,Stohlmann,F.
Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood
Blood,22,1963,619-629
55. Torelli,U.,Grossi,G.,Arturi,T.,Emilia,G.
RNA- and Protein-Synthesis in normal peripheral Mononuclear Leucocytes
Acta haematologica 30,1963,129-137
56. Torelli,U.,Torelli,G.M.,Andreoli,A.,Mauri,C.
The Effect of L-Asparaginase on the Synthesis and Processing of Ribosomal Precursor RNA in PHA-stimulated Lymphocytes
Experientia, Birkhäuser Verl.,Basel
57. Voigt,W.-H.,Grundmann,E.,Bierling,R.
The Cytomorphical Effects of L-Asparaginase in Sensitive Cells
Recent Results in Cancer Research,1970, S.140-150
Springer Verl.Berlin, Heidelberg, New York
58. Weiner,M.S.,Waithe,W.I.,Hirschhorn,K.
L-Asparaginase and Blastogenesis
Lancet II,1969,748

Allen, die beim Zustandekommen dieser Arbeit mitgeholfen haben, danke ich an dieser Stelle herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Begemann, Herrn Dr. U. Fink und Frl. E. Heil.

Lebenslauf

Als Sohn des Intendanten Willi Hanke und seiner Frau Helene wurde ich am 10.11.1945 in Nürnberg geboren.

1950 zog meine Familie nach Bremen um.
Dort legte ich nach dem Besuch der Volksschule und des Gymnasiums am Barkhof 1966 mein Abitur ab.

Seit dieser Zeit studiere ich in München Medizin, absolvierte 1967 das Vorphysikum und 1968 das Physikum.

Im Wintersemester beabsichtige ich, mein Staatsexamen abzulegen.

Klaus Hanke

München, 1971